

MESURE DE L'UTILISATION DE SUBSTRATS ORGANIQUES
PAR LES COMMUNAUTES MICROBIOLOGIQUES DES EAUX
NATURELLES.

Jacques Putman
Gilles Billen,
Laboratoire d'océanographie
ULB.

PRINCIPES.

La méthode est basée sur l'emploi de traceurs radioactifs. Une dose connue (0.1 à 1 μCi) de substrat radioactif est ajoutée à un échantillon d'eau fraîchement prélevée. La radioactivité spécifique du substrat utilisé doit être suffisante pour que la quantité de substrat radioactif ajoutée soit négligeable devant la concentration de ce substrat dans le milieu. Après incubation, un volume connu de l'échantillon est filtré sur une membrane qui retient les bactéries. Le filtrat est recueilli dans un flacon en verre contenant de la soude pour fixer le CO_2 .

Le comptage de la radioactivité retenue sur le filtre permet d'estimer le pourcentage du substrat incorporé pendant le temps d'incubation. D'autre part, le CO_2 radioactif produit est extrait par acidification et bullage du filtrat, puis piégé dans un flacon contenant un piège à CO_2 dans un milieu scintillant. La mesure de la radioactivité de ce piège permet de calculer le pourcentage du substrat respiré pendant le temps d'incubation.

MODE OPERATOIRE.

1. Incubation.

radioactivité: 0.1 à 1 μCi par échantillon de 300 ml.

incubation: jusqu'à 4 h., à l'obscurité.

prélèvement de 10 à 20 ml; filtration sur membrane de 0.2 μ de porosité; rinçage du filtre par env. 5 ml d'eau du point; récupération du filtrat dans un flacon de verre contenant 2 cc de NaOH 0.1 N (la soude a pour double fonction de fixer le CO_2 et d'empêcher le développement ultérieur de microorganismes qui pourraient respirer le substrat organique résiduel; pour se prémunir entièrement de ce danger, il y a lieu de conserver les filtres le moins longtemps possible avant de les traiter, et en frigo.)

Il y a lieu, pour chaque expérience de mesurer la radioactivité initiale sous forme particulaire et sous forme de CO_2 par un prélèvement au tps 0.

2. Extraction du CO_2 .

L'extraction se fait au moyen du dispositif représenté dans la Fig. 1.

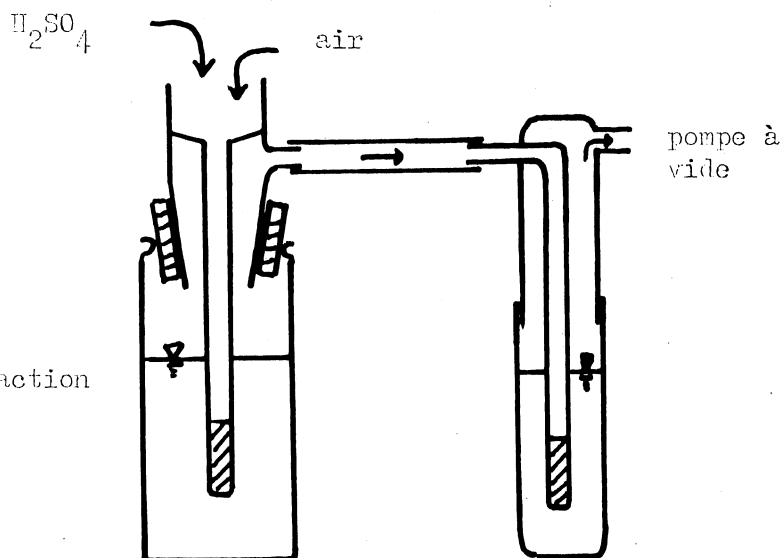


Fig. 1: Dispositif pour l'extraction du CO_2 dans le filtrat.

Le bullage est réalisé directement dans le flacon de verre dans lequel on a recueilli le filtrat. En effet, un précipité de carbonate reste en partie fixé à la paroi du flacon et serait perdu par transvasement. Le filtrat est acidifié, après fermeture du dispositif d'extraction par 1 ml d' H_2SO_4 concentré. Il est nécessaire d'agiter le flacon après cette addition, pour obtenir une bonne homogénéisation.

Le piège à CO_2 est constitué par 10 ml d'un mélange Carbosorb (Packard)-lipoluna (Lunac) (1-4).

Le temps de bullage nécessaire est d'environ 10 min. comme le montre la Fig. 2.

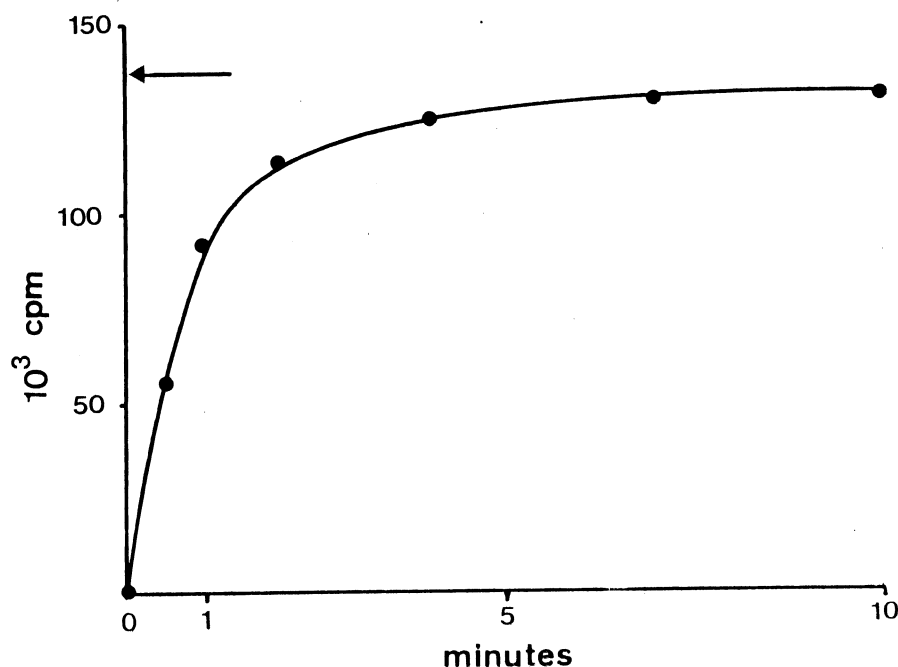


Fig. 2. Rendement de l'extraction du CO_2^x en fonction du temps de bullage. (La flèche indique la quantité de radioactivité ajoutée sous forme de HCO_3^- dans l'expérience).

3. Traitement des filtres.

Dissolution dans 1.5 ml de Lumasolve (Lumac). Attendre 1/4 h. en agitant de temps en temps.

Ajouter 0.1 ml d' H_2O_2 . Attendre jusqu'à décoloration.

Ajouter 10 ml de Lumagel (Lumac) et 0.04 ml d'acide ascorbique à 15% pour détruire l'excès d' H_2O_2 .

laisser stabiliser 3 à 4 jours avant de compter la radioactivité (chemiluminescence).

4. Comptage de la radioactivité.

Sur un scintillateur Beckmann, dans la fenêtre du ^{14}C , on a obtenu les rendements de comptage suivants:

Filtres:	91 %
CO_2 :	76 %

RESULTATS ET REPERECUTION.

Appliquée en cinétique au cours du temps, la méthode fournit des courbes en fonction du temps: soit parfaitement linéaires (ex: Fig. 3), soit légèrement convexe pour la courbe d'incorporation et légèrement concave pour la courbe de respiration, pendant la première heure d'incubation (Fig. 4 et 5).

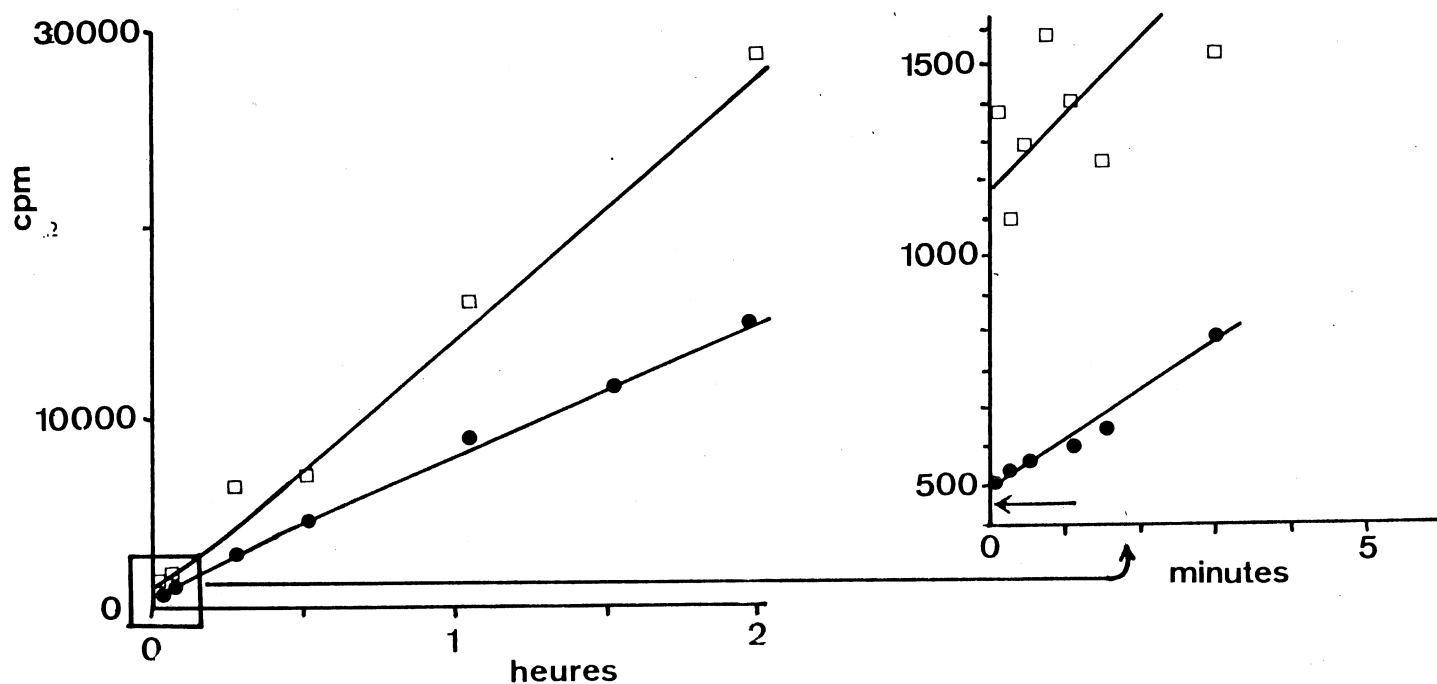


Fig. 3. Incorporation de lactate par un échantillon de l'eau de l'Escaut (Anvers, janvier 1978). (incorporation: ●, respiration: □.)

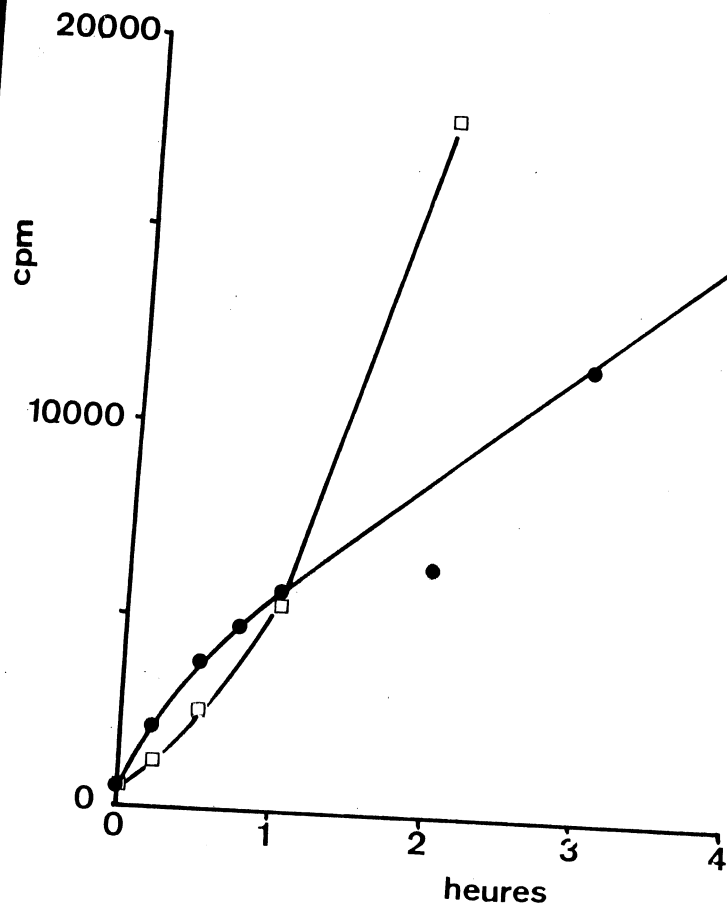


Fig. 4. Incorporation (●) et respiration (□) de l'Acétate par un échantillon d'eau de l'Escaut (Hansweert, octobre 1977).

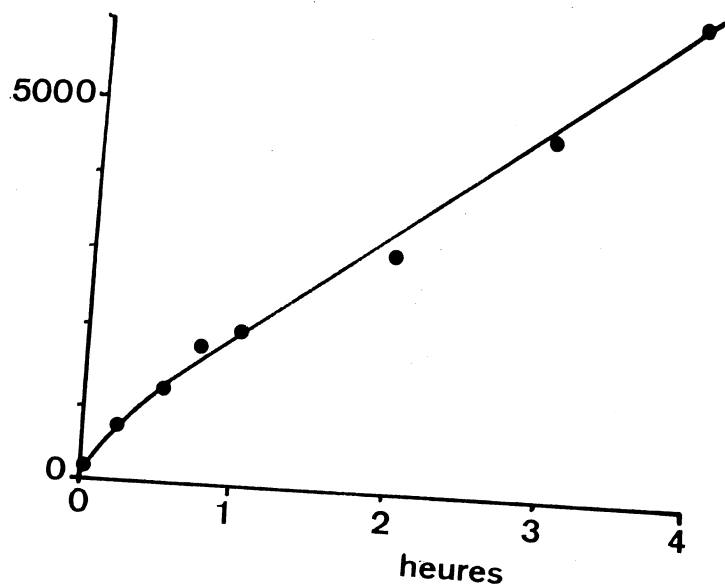
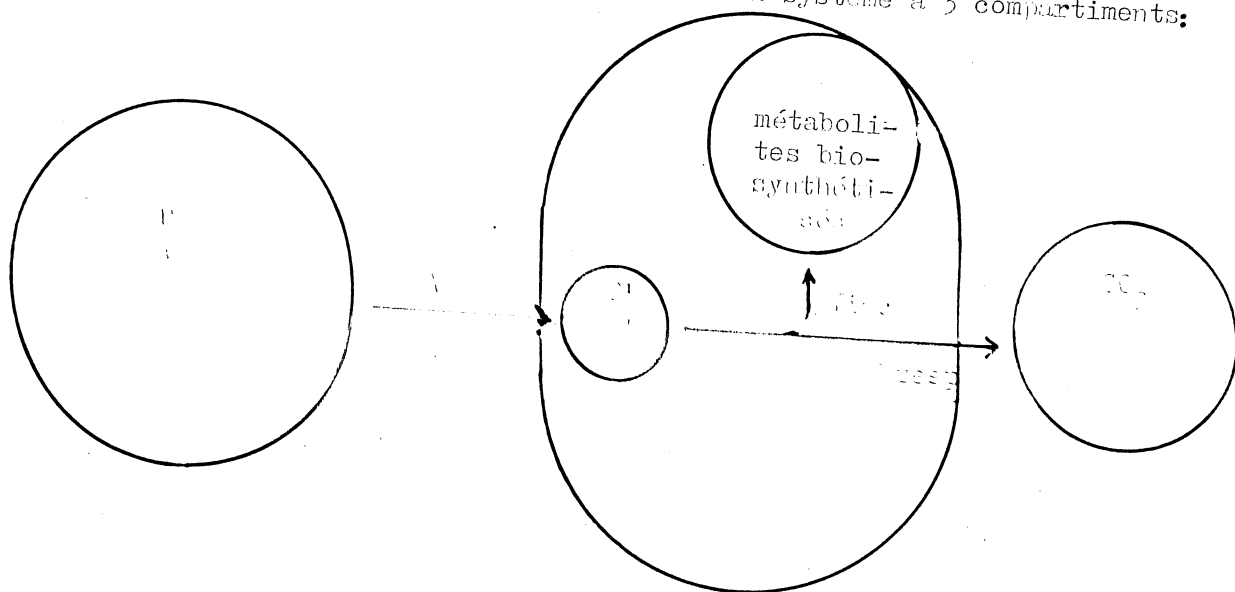


Fig. 5. Incorporation (●) de lactate par un échantillon d'eau de l'Escaut (Hansweert, octobre 1977).

Ce dernier type de résultat peut s'interpréter facilement si l'on considère que le système étudié est un système à 3 compartiments:



1. Le pool extérieur du substrat, P, auquel on donne au temps zéro une radioactivité spécifique a , supposée rester constante au cours de l'incubation.

2. Le pool interne du substrat libre, P' , dont la radioactivité spécifique a' évolue au cours du temps selon la loi

$$P' \frac{da'}{dt} = V a - (V_{inc} + V_{resp}) a'$$

En situation stationnaire, $V_{inc} + V_{resp} = V = cte$, et

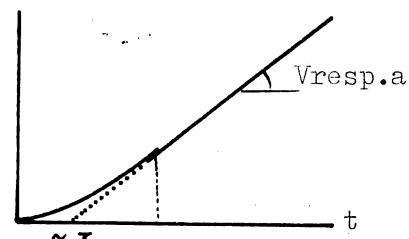
$$a' = a (1 - e^{-t/\tau})$$

où $\tau = \frac{P'}{V}$, temps de turnover du pool interne P' .

3. La radioactivité du CO_2 produit évolue alors de la façon suivante:

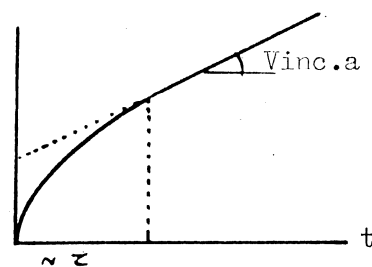
$$\frac{dCO_2^*}{dt} = V_{resp} \cdot a'$$

$$CO_2^* = V_{resp} \cdot a \cdot t - V_{resp} \cdot a \cdot \frac{P'}{V} (1 - e^{-t/\tau})$$



D'autre part, la radioactivité sur le filtre évolue selon la loi:

$$\begin{aligned} \text{filtre}^* &= P' a' + V_{inc} \cdot a \cdot t - V_{inc} \cdot a \cdot \frac{P'}{V} (1 - e^{-t/\tau}) \\ &= V_{inc} \cdot a \cdot t - P' \cdot a \cdot (1 - e^{-t/\tau}) (1 - V_{inc}/V) \end{aligned}$$



Les cinétiques observées peuvent donc n'être linéaires qu'après un certain temps dépendant du temps de turnover du pool interne du substrat considéré dans les cellules bactériennes.